



0703088

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2001年 4月24日

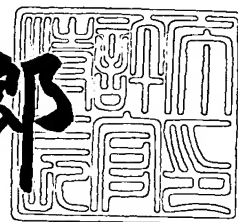
出 願 番 号  
Application Number: 特願2001-125525  
[ST. 10/C]: [JP2001-125525]

出 願 人  
Applicant(s): 北海道ティー・エル・オー株式会社

2003年 7月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3054972



【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1I0093

【提出日】 平成13年 4月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市清田区北野 3 条 1 丁目 1 0 番 4 9 号

【氏名】 三高 俊広

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉忠在地町 5 2 6

【氏名】 杉本 真一

【特許出願人】

【識別番号】 800000024

【氏名又は名称】 北海道ティー・エル・オー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100059959

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100067013

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 文昭

【選任した代理人】

【識別番号】 100082005

【弁理士】

【氏名又は名称】 熊倉 禎男

【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 穴戸 嘉一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100096194

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝組織誘導に適した小型肝細胞高含有コロニー、その調製方法、小型肝細胞コロニーからの肝組織誘導方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コロニーを構成する総細胞の70%以上が小型肝細胞で占められている、小型肝細胞高含有コロニー。

【請求項 2】 コロニーを構成する総細胞数が10個～30個である、請求項 1 に記載の小型肝細胞高含有コロニー。

【請求項 3】 (i) 肝臓より肝細胞を分離すること、  
(ii) 分離された前記肝細胞を、実質細胞をより多く含む重量画分と、非実質細胞をより多く含む実質細胞をより少なく含む軽量画分とに分画し、前記軽量画分を回収すること、  
(iii) 前記軽量画分中の細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて培養し、小型肝細胞コロニーを形成させること、および、  
(iv) 総細胞数が10個～30個である小型肝細胞コロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法。

【請求項 4】 (i) コロニーを形成している小型肝細胞を酵素を作用させ、または、作用させずに培養皿から剥がし、回収すること、  
(ii) 回収された前記小型肝細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて継代培養し、総細胞数が10個～30個であるコロニーを形成させること、および、  
(iii) 前記総細胞数が10個～30個であるコロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法。

【請求項 5】 (i) 請求項 1 または 2 に記載の小型肝細胞高含有コロニーを培養すること、  
(ii) 前記培養された小型肝細胞高含有コロニーを含む前記培地に細胞外基質を添加すること、  
(iii) 前記細胞外基質を添加された培地で培養された小型肝細胞高含有コロニーを細胞外基質を含まない培地で更に培養すること、を特徴とする、小型肝細胞高含有コロニーの肝組織への成熟化方法。

【請求項 6】 培養開始時の小型肝細胞高含有コロニー密度が、500～1000コロニー/cm<sup>2</sup>であることを特徴とする、請求項 5 に記載の移植用肝組織調製方法。

【請求項 7】 (i) 請求項 1 または 2 に記載の小型肝細胞高含有コロニーを生体吸収性シート上に置くこと、

(ii) 前記シートをシートごと培地中に置くことにより、前記シート上の小型肝細胞高含有コロニーを培養すること、  
を特徴とする、

小型肝細胞高含有コロニーの肝組織への成熟化方法。

【請求項 8】 培養開始時のシート上のコロニー密度が、500～1000コロニー/cm<sup>2</sup>であることを特徴とする、請求項 7 に記載の成熟化方法。

【請求項 9】 (i) 請求項 1 または 2 に記載の小型肝細胞高含有コロニーを生体吸収性シート上に置くこと、

(ii) 前記シートをシートごと無血清培地中に置くことにより、前記シート上の小型肝細胞高含有コロニーを培養すること、  
を特徴とする、移植用肝組織調製方法。

【請求項 10】 培養開始時のシート上のコロニー密度が、500～1000コロニー/cm<sup>2</sup>であることを特徴とする、請求項 9 に記載の移植用肝組織調製方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、*in vitro*で肝組織を誘導するために適した小型肝細胞コロニー、その調製方法、前記小型肝細胞コロニーからの効率的な肝組織への誘導方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

ヒトは種々の疾患により、例えば、肝炎、肝硬変、肝癌などにより肝機能不全状態になる。現在のところ人工肝臓は実用段階にあるとは言えないため、このような疾患の根本的な治療は肝臓移植に頼らざるを得ないのが現状である。しかも

、我が国を初め世界各国において、肝臓移植を必要としている患者は多数存在するにもかかわらず、臓器を提供するドナーの数は必要数の 1 割を満たすのがやっとなのである。従って、肝臓移植に使用できるような肝組織を *in vitro* で形成させる方法、そのような方法に使用できる肝組織の前駆細胞コロニーおよびその *in vitro* 調製方法が望まれている。

一方、肝臓は *in vivo* では再生力の高い臓器として知られているが、*in vitro* において肝臓を再生させることは成功しているとは言えない。現在、細胞培養レベルでは、直接肝臓を構成している細胞として、肝細胞、胆管上皮細胞、などを個別に培養増殖できているに過ぎない。また、移植可能な肝組織の調製方法として、器官培養、ES細胞を用いた方法が研究されている。しかしながら、器官培養で十分な大きさの臓器を形成させることは成功しておらず、また、肝臓を形成する全ての細胞をES細胞から調製することにも成功していない。特にES細胞は有望視されてはいるものの、患者それぞれからES細胞を調製する必要があり、更に、肝臓を構成する各細胞を増殖させなければならず、その方法は未だ確立されていない。

#### 【0 0 0 3】

一方、本発明者らは、肝細胞としての機能を十分に維持しつつ、幹細胞のように増殖能の旺盛なある種の細胞が成体肝臓内に存在することを報告し(Mitaka T. ら、Hepatology, 16, 1992, 440-447)、これを小型肝細胞と称してきた。本発明者らは、小型肝細胞はウシ胎仔血清やニコチンアミド、EGFなどを加えた培養液で培養すると、最初単層のコロニーを形成し、やがて、周囲を肝上皮細胞や星細胞等の非実質細胞に囲まれるようになることを示した。また、更に培養を続けると、グルタミン合成酵素やカルバモイルリン酸合成酵素の発現が見られ、ミトコンドリアやペルオキシゾーム、グルコーゲン顆粒が顕微鏡的に観察できるようになることを報告してきた。しかしながら、移植可能な程度の肝組織を調製するための小型肝細胞の調製方法、肝組織の誘導方法の開発はなお未解決であった。

#### 【0 0 0 4】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、移植可能な肝組織を調製する方法、そのために適した細胞コロニー

およびその調製方法を提供することを目的とする。より具体的には、本発明は移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞コロニー、その調製方法、その小型肝細胞コロニーから肝組織を誘導する方法を提供することである。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、全細胞の約70%以上が小型肝細胞によって構成されている小型肝細胞高含有細胞コロニー、特に、約10個～約30個の細胞からなり、小型肝細胞数が全細胞数の約70%以上を構成する小型肝細胞高含有細胞コロニーである。

また、本発明は、肝臓から単離された、または、継代された培養中の小型肝細胞を培養初期に細胞コロニーとして回収することを特徴とする、移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。特に、本発明は、肝臓から単離された、または、継代された培養中の小型肝細胞を含む10個～30個の細胞からなる細胞コロニーが形成された時点で、非酵素的に単離することを特徴とする、移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。

即ち、本発明は、

- (i) 肝臓より肝細胞を分離すること、
- (ii) 分離された前記肝細胞を、実質細胞をより多く含む重量画分と、非実質細胞をより多く含む実質細胞をより少なく含む軽量画分とに分画し、前記軽量画分を回収すること、
- (iii) 前記軽量画分中の細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて培養し、小型肝細胞コロニーを形成させること、および、
- (iv) 総細胞数が10個～30個である小型肝細胞コロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。

また、本発明は、

- (i) コロニーを形成している小型肝細胞を酵素を作用させ、または、作用させずに培養皿から剥がし、回収すること、
- (ii) 回収された前記小型肝細胞をニコチンアミドを添加した培養液を用いて継代培養し、総細胞数が10個～30個であるコロニーを形成させること、および、



(iii) 前記総細胞数が10個～30個であるコロニーを回収すること、を含む、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法である。

更に、本発明は、上述のようにして調製された、小型肝細胞が全細胞数の約70%以上を構成する細胞コロニーである。

また、本発明は、上述のように単離した小型肝細胞高含有コロニーを培養し、更に細胞外基質を添加して一定期間培養し、次に、細胞外基質を添加しない培地で培養することを特徴とする、小型肝細胞コロニーの肝組織への誘導方法である。

特に、本発明は、上述のように単離した小型肝細胞コロニーを生体適合性材質製のシート上に移し、更に一定期間培養することを特徴とする、小型肝細胞コロニーの肝組織への誘導方法である。

#### 【0006】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞コロニー、その調製方法、その小型肝細胞コロニーから肝組織を誘導する方法を提供することである。以下に、本発明のいくつかの実施態様を記載する。なお、本明細書において、「細胞コロニー」または「コロニー」とは、細胞の増殖によって形成された細胞集塊をいい、構成する細胞数とは無関係に使用する。また、「小型肝細胞コロニー」の語は、小型肝細胞を含むコロニーを意味し、コロニーを構成する細胞数およびコロニーに含まれる小型肝細胞の割合とは無関係に使用する。一方、本明細書において「小型肝細胞高含有コロニー」とは、小型肝細胞を含む細胞集塊のうち、その細胞集塊を構成する細胞総数の約70%以上が小型肝細胞であるコロニーをいう。

#### 【0007】

本発明の方法には小型肝細胞を使用する。本明細書において、「小型肝細胞」とは、単に肝臓に由来する小型の細胞を意味するものではなく、以下に記載する方法、あるいはこれに準じた方法を用いて肝臓から単離される細胞であって、強い増殖能を有し、アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン(CK) 8、CK18などのマーカーについて成熟肝細胞とほぼ同様の表現型を示し、超微構造的にも

肝細胞としての特徴を有する、肝臓由来の特別な種類の小型の細胞を意味する。この細胞は発明者らによって見出されたものであり、より詳しくはMitaka T. ら、Hepatology, 16, 440-447, (1992)、Mitaka, T, Sato F, Mizuguchi Tら、Hepatology, 29, 111-135 (1999)に記載されている。

#### 【0008】

本発明に使用する小型肝細胞は、例えば以下のように調製することができる。ヒトその他の動物から採取した肝臓組織をコラゲナーゼ等を含む溶液で処理すると肝臓由来の細胞を得ることができる。この場合、通常のコラゲナーゼ肝灌流法を利用することができる。得られた細胞懸濁液は必要に応じて適当な大きさのメッシュ等を通し、未消化の組織残渣その他の組織破砕物等を除去してもよい。この細胞懸濁液をそのまま培養しても小型肝細胞コロニーを得ることもできるが、実質細胞および不要な組織破砕物等を可能な限り除去してから培養することが好ましい。実質細胞の除去は、以下のように低速遠心によって行なうことができる。低速遠心とは、実質細胞および不要な組織破砕物等を多く含む画分と、非実質細胞を多く含む軽画分とを分離するために十分な条件をいい、好ましくは、実質細胞および不要な組織破砕物等を主として含む画分と、小型肝細胞および非実質細胞を多く含む実質細胞をほとんど含まない軽画分とを分離するために十分な条件をいう。このような条件で上述したような方法で得られる肝臓由来の細胞を分画すると、小型肝細胞は前述の軽画分により多く得られる。より具体的には、例えば、この細胞懸濁液を低速遠心、例えば50 x gで1分間遠心することにより、主として実質細胞を含む重い画分と、星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞等の非実質細胞を主として含む比較的軽い細胞を含む軽い上清画分とに分画することができる。小型肝細胞はこの遠心条件下で上清画分に多く得られる。

#### 【0009】

加速度が大きくなるほど、また、遠心時間が長くなるほど上清画分中の実質細胞の割合は減るが、沈殿する小型肝細胞の割合も増加するため、遠心は約50 x gにて約1分間以下とするのが好ましい。上清画分は更に遠心、沈殿、懸濁を繰り返して実質細胞および不要な組織破砕物等を除去することもできる。より具体的には、例えば、上清画分を、50 x gで5分間遠心し、沈殿を適当な培地に懸濁し

、更に50 x gで5分間遠心する。沈殿を同様な培地に懸濁し、再び50 x gで5分間遠心する。得られた沈殿を同様な培地に懸濁し、150 x gで5分間遠心して、沈殿した細胞を新鮮な培地に懸濁する。細胞懸濁液中の細胞数を数え、その後の培養、あるいは処理のために必要な細胞密度となるように調製することができる。通常、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mlの密度に調製される。

#### 【0 0 1 0】

このようにして調製した細胞は、血清、ニコチンアミド、ビタミンC、抗生物質、増殖因子、その他の細胞培養に一般的に使用される添加物を更に含む基本培地、例えば、これらを添加したダルベッコ改変イーグル培地等で37℃にて培養することができる。小型肝細胞を増殖させるあるいは維持するための培地は、ニコチンアミドを含み、更にコロニー形成促進のためにビタミンC、増殖因子、DMSO等を含むことが好ましい。ビタミンCは通常、アスコルビン酸2リン酸として添加し、その濃度は、好ましくは0.1mM～1.0mM、より好ましくは、0.5mM～1.0mMであり、ニコチンアミドは比較的高濃度で使用され、好ましくは1～20mM、より好ましくは5mM～10mMで使用する。増殖因子としては、上皮細胞増殖因子（EGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ （TGF $\alpha$ ）等が利用でき、TGF $\alpha$ が特に好ましい。TGF $\alpha$ を添加する場合には、好ましくは1  $\mu$ g/l～100  $\mu$ g/l、より好ましくは5  $\mu$ g/l～50  $\mu$ g/lの濃度で使用する。

#### 【0 0 1 1】

また、初代培養においてはDMSOは培養開始4日目から好ましくは約0.1～約2% (v/v)、より好ましくは約0.5%～約1.5% (v/v)の濃度で添加する。肝組織への誘導のためには、前述と同じ組成の培地にDMSOは継代1日目から1%の濃度で培地に添加するのが好ましい。また、小型肝細胞の初代培養および継代維持のためには、血清たとえばウシ胎仔血清(FBS)を添加することができるが、移植のための肝組織への誘導のためには不要なタンパク質の混入を避けるために無血清培地を使用することが好ましい。血清を用いる場合は、拒絶反応を最小限に抑えるために、移植対象の動物種由来の血清を用いることが好ましい。培地はほぼ1日おき、通常、週に3回交換する。

#### 【0 0 1 2】

本発明で使用する小型肝細胞または小型肝細胞高含有コロニーの培養容器としては、通常の細胞培養に使用される培養皿を使用することができる。一般には接着細胞の培養はコラーゲン被覆をした培養皿が使用され、例えば、ウシ真皮、ラットの尾部由来のコラーゲンを被覆した種々の大きさの培養皿が商業的に入手可能であり、また必要であればそのような培養皿を調製することもできる。本発明においても小型肝細胞の培養にもそのような培養皿を使用することができるが、肝組織形成に適した小型肝細胞コロニーを調製するためにはコラーゲンを被覆しない培養皿を使用することが好ましい。なぜならば、細胞外基質が少ないほどより温和な条件で細胞が剥がれやすく、かつ、コラーゲン等で被覆しない場合には、小型肝細胞が優先的に容器から剥離する傾向があるからである。本発明においては、培養は60mmの培養皿あたり、比較的高密度、具体的には約  $4 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$  個の細胞密度で開始するのが好ましい。培養には、通常の5%炭酸ガスインキュベーターを使用することができる。炭酸ガス濃度および培養温度は、通常の培養細胞に許容される範囲であれば本質的ではない。

#### 【0013】

このような条件で培養すると、約1週間程度で明瞭なコロニーが確認できるようになる。このときのコロニーを構成する細胞数は約10～約30個程度である。本明細書において、培養期間について「早期」というのは、このような時期をいう。上記培養条件下で培養した場合、この時期に見られる細胞コロニーは主として小型肝細胞からなり、非実質細胞によって周囲を完全に包囲されるには至っていない。

本発明においては、小型肝細胞以外の細胞、例えば星細胞や肝上皮様細胞等を含む非実質細胞、を可能な限り含まない小型肝細胞コロニーを使用することが好ましい。具体的には、例えば、コロニーを構成する細胞総数の約70%以上を小型肝細胞が占めるコロニーを使用することが好ましく、より好ましくは、コロニーを構成する細胞総数の約80%以上、特に好ましくは85%以上が小型肝細胞であるコロニーが使用される。前述のような方法で肝臓から単離した小型肝細胞を前述のような培地および条件で培養した場合に生じる、細胞数が約10～約30個からなるコロニーは一般にそのような条件を満たしている。従って、本発明の肝組織

調製方法のために、このような早期に単離される小型肝細胞コロニーを利用することができる。

#### 【0 0 1 4】

形成されたコロニーは以下のような温和な条件、例えば非酵素的方法で培養容器から剥離して、新しい培地に移すことが好ましい。例えば、金属キレート剤および種々の非酵素的剥離剤を使用して非酵素的に細胞を培養皿から剥がすのが好ましい。使用し得る金属キレート剤としては、細胞毒性の少ないものであればよく、接着細胞の剥離処理に一般的に使用されるもの、例えばEDTA、EGTA及び／またはその塩を、それぞれについて一般的な濃度で 사용할 ことができる。EDTAのナトリウム塩が特に好ましく、好ましくは0.01～0.05% (w/v)、より好ましくは0.01～0.02% (w/v)の濃度で使用される。EGTAナトリウム塩の場合は、約0.5mMで使用するの が好ましい。処理時間は、細胞をリンスする程度（数秒間）に短くてもよいが、好ましくは約30秒～約10分間、より好ましくは約1分間～約5分間である。長時間の処理は細胞に与える損傷が大きいため、可能な限り短くすることが好ましい。

#### 【0 0 1 5】

非酵素的細胞剥離剤としては、Ca、Mgを含まないHanksの緩衝液(pH7.3～7.5)にEDTA、グリセロール、クエン酸ナトリウム等を添加した溶液が利用でき、例えばSigma社からCell dissociation solutionの名で調製済みの非酵素的細胞剥離剤を商業的に入手することができる。より具体的には、例えば約0.02%のEDTAを含むリン酸緩衝液を細胞上に注ぐ。数分間静置し、その後EDTA溶液を除いた後、Cell dissociation solutionのような非酵素的細胞剥離剤を注ぎ、例えば37℃にて約5分間～約30分間、好ましくは約10分間～15分間静置する。細胞に与える損傷を最小限にするため、非酵素的剥離剤による処理も金属キレート剤処理と同様、可能な限り短くするのが好ましい。次に、細胞に与える損傷を最小限にすべく、静かにピペッティングすることにより培養皿から小型肝細胞高含有コロニーを剥がす。本発明の小型肝細胞高含有コロニーは、酵素を使用しないこのような温和な条件でも極めて剥離しやすく、上述した方法によって早期にコロニーを単離することにより、小型肝細胞以外の細胞、特に非実質細胞の混入を更に低く抑える

ことができる。

必要に応じてこのコロニーを遠心、懸濁を繰り返すことにより洗浄し、最後に適切な培地等に懸濁する。場合により、位相差顕微鏡等を用いてコロニーあたりの細胞数および／または小型肝細胞の割合を測定してもよいが、上述したように早期にコロニーを単離すれば通常は不要である。コロニー数は例えばIPlabのような画像解析プログラムを用いて計測することができる。また、コロニーを構成する細胞数は、アルブミンやサイトケラチン8染色のようなマーカーで免疫染色して位相差顕微鏡を用いて測定することができ、また、位相差顕微鏡とCCDカメラを用いてコンピュータに画像を記録し、経時的に測定することもできる。

#### 【0 0 1 6】

増殖維持のために継代する場合において使用する培地は、肝臓から直接得られた小型肝細胞を得る場合と同様にニコチンアミド、ビタミンC、増殖因子、DMSO等を含む培地を用いることができ、ニコチンアミド、ビタミンC、増殖因子、DMSO等の濃度も同様である。肝組織形成のために継代する場合も同等の培地が使用できるが、肝組織移植に不要なタンパク質の混入を最小限にするため、前述したように無血清とすることが好ましい。

また、このように早期に単離され、非実質細胞を約30%未満程度しか含まない小型肝細胞コロニーは、増殖因子に対する依存性が強度に低下し、増殖因子を実質的に含まない培地でも培養可能である。従って、増殖因子が増殖のために必須でないことも本発明の小型肝細胞高含有コロニーが有する特徴の一つである。更に、単離された本発明の小型肝細胞高含有コロニーの他の特徴は、上述のような培地で継代培養した場合、肝細胞以外の細胞が少ないために成熟化がおこりにくく、平面的に増殖を続けることである。

#### 【0 0 1 7】

このようにして肝臓から直接単離された細胞から形成された小型肝細胞高含有コロニーはそのまま培養を続けると、成熟化せずに増殖させることができる。増殖した小型肝細胞コロニーを上述したような非酵素的方法で単離し、さらに細胞数約10個以下のコロニーに分割して継代培養することもできる。そのように継代されたコロニーは上述したような培地を用いて細胞数約10個～約30個のコロニ

ーを形成するまで培養することができる。この方法で形成される細胞数約10個～約30個のコロニーもまた本発明の小型肝細胞高含有コロニーに含まれる。この継代操作を1以上繰り返して得られる細胞数約10個～約30個のコロニーもまた本発明の小型肝細胞高含有コロニーに含まれる。

#### 【0018】

上述のように培養して形成された主として小型肝細胞からなる小型肝細胞高含有コロニーは、更に細胞外基質の存在下で短期間培養し、続いて細胞外基質を含まない培地で培養することにより生体内の肝細胞に極めて近くまで成熟化を誘導することができる。

小型肝細胞の割合が約70%以上である小型肝細胞高含有コロニー、好ましくは約10～約30個の細胞からなり小型肝細胞の割合が約70%以上である小型肝細胞高含有コロニーを500～10,000コロニー/ml、好ましくは、1,000～4,000コロニー/ml、より好ましくは1,500～3,000コロニー/mlの濃度で250～2,000コロニー/cm<sup>2</sup>、好ましくは500～1,000コロニー/cm<sup>2</sup>になるように培養皿に播き、前述したような培地（無血清）で培養する。肝組織への成熟化を誘導するためには、培養皿中であまり密になりすぎないように培養することが好ましい。例えば、約10日間～14日間培養すると、小型肝細胞高含有コロニーは面積で約5倍、細胞数にして約6倍ほどに増殖し（図1、2）、培養皿の底面積の約20%～30%程度が細胞で覆われる。細胞外基質を添加する時期としては、このような時期のコロニーが特に好ましい。成熟化の誘導は、ラミニン、コラーゲン、種々のプロテオグリカン、エンタクチン、フィブロネクチン等を含む細胞外基質を50 $\mu$ g/ml～1mg/ml、好ましくは100 $\mu$ g/ml～1mg/mlの濃度で培養液に添加することによって促すことができる。

#### 【0019】

このような濃度の細胞外基質と共に約1～3日間培養し、その後細胞外基質を含まない培地で培養を続けることにより、小型肝細胞コロニーの成熟化は顕著に進む。例えば、細胞外基質を含まない培地に戻した翌日から小型肝細胞の形態変化が明瞭に観察される。そのまま細胞外基質を含まない培地で培養すると、小型肝細胞の成熟化は更に著しく進行し、コロニーは大型化するとともに成熟化して

生体内肝組織に極めて近い構造を形成する。小型肝細胞の成熟化に使用し得る細胞外基質としては、ラミニン、IV型コラーゲンを含むことが好ましく、基底膜成分（例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、ラミニン）の多くを含むことがより好ましい。たとえば商業的に入手可能な、商品名マトリゲル（Matrigel）の名称で販売されている（Collaborative Biomedical Products社）、Engelhorn肉腫（EHS）から抽出された細胞外基質調製物（ラミニン70%、IV型コラーゲン15%、プロテオグリカン、エンタクチン等を含む）が特に好ましい。

このようにしてin vitroで形成された、生体内肝組織に極めて近い組織は、肝機能の種々の研究に使用することができるのみならず、肝移植に使用することができる。

#### 【0020】

本発明の小型肝細胞高含有コロニーを生体適合性であって生体吸収性または生分解性材料からなるシート上に置くことによって、肝組織移植に特に適した肝組織を形成させることができる。なお、本明細書において「生体吸収性」とは主として生体の生理作用によって代謝され若しくは細胞内に取り込まれる性質を言い、「生分解性」とは生体の生理作用によって分解される性質を言うが、両者は重複する部分もあるため厳密に区別せずに使用する。また、本明細書において「生体適合性」とは生体によって問題となるほど異物として認識されない性質を言う。

本発明に使用し得る生体適合性かつ生体吸収性シートは繊維構造を有することが好ましい。すなわち、本発明の方法において、シートの繊維構造によって形成される腔に本発明の小型肝細胞高含有コロニーが入り込み、腔内の狭い環境において自身が分泌する細胞外基質の濃度が高まるために成熟化が著しく刺激され、さらに、狭い空間のなかで細胞間の接着面積が増大するために個々の細胞の立体化が促され、それらの総合的結果として肝組織が形成される。したがって、本発明の方法に使用するシートはひだ状の構造を有するシートであることが好ましい。

本発明で利用し得る生体適合性かつ生体吸収性材料には例えば、コラーゲンシート、コラーゲンスポンジおよびポリグリコール酸シートが含まれる。商業的に



入手可能なそのような材料としては、例えば、Integra Life Sciences Corporationからヘリスタット (Helistat) の商品名の下に販売されている吸収性コラーゲンシート、および、グンゼ社からネオヴェイル (Neoveil) の商品名の下に販売されている吸収性ポリグリコール酸フェルトが挙げられる。

#### 【 0 0 2 1 】

本発明の小型肝細胞高含有コロニーを上述のようなシート上に置く場合は、液量を少なくするため比較的高濃度、例えば500～10,000コロニー/ml、好ましくは1,000～4,000コロニー/ml、より好ましくは1,500～3,000コロニー/mlの濃度に調製した細胞懸濁液を、250～2,000コロニー/cm<sup>2</sup>、好ましくは500～1,000コロニー/cm<sup>2</sup>になるようにシートに滴下する。コロニーがシートに充分接着するまで静置する。静置時間はコロニーがシートに接着するに充分であればよいが、少なくとも20分間以上、好ましくは30分間以上、特に好ましくは1時間以上である。その後、小型肝細胞の培養に適した培地を加える。この培地は、小型肝細胞を肝臓から単離する際に使用する培地でよいが、無血清であることが好ましい。実施例中の表2に記載した小型肝細胞培養液IIは本発明の小型肝細胞高含有コロニーをシート上で培養するために好ましい培地である。このような条件下で培養すると、シート上の小型肝細胞コロニーの成熟化は著しく進行し、コロニーは大型化するとともに成熟化して約10日～約15日で生体内肝組織にきわめて近い構造をシート上で形成する。更に培養を続けて肝組織を増殖させてもよい。しかしながら、生体吸収性または生分解性シートは培養液中で溶解する傾向があるため肝移植のためには培養期間は約3週間までとするのが取り扱い上好ましい。

本発明の小型肝細胞高含有コロニーは、生体適合性であって生体吸収性または生分解性材料からなるシート上に置き、更に細胞外基質を添加することによっても、肝組織移植に特に適した肝組織を形成させることができる。この場合の細胞外基質を添加する時期、濃度、使用できるシート、および成熟化に使用する細胞数等の条件は、細胞外基質およびシートを単独で使用する場合と同等であってよい。しかしながら、細胞外基質の濃度は適宜低下させてもよい。例えば、コロニーがシートに十分に付着した後、すなわち、シートに載せてから約1時間後以降にラミニン、IV型コラーゲンやそれらを含むMatrigel等を100～1,000mg/lの濃

度になるように培養液に加えることにより成熟化を促進させることができる。細胞外基質は1度投与すればよく、その後は細胞外基質を含まない培養液で培養してよい。

このようにしてシート上で形成された肝組織は、シートごとそのまま肝移植に使用することができる。

#### 【0022】

上述のように、細胞外基質の添加、またはシート上での培養によって成熟化したコロニーに含まれる細胞の肝細胞としての性質は種々のマーカーを解析することによって確認することができる。使用するマーカーは成熟前の小型肝細胞、例えば、単離直後の小型肝細胞高含有コロニーに比較して成熟肝細胞において顕著な差異がみられるマーカーであればよい。例えば、肝細胞特異的マーカーとして知られる種々の既知のマーカーが利用できる。

解析は例えば以下のように行なうことができる：細胞を適当なバッファー、例えば、Hepesバッファー（10mM Hepes、0.25Mシュウクロース、0.5mM MgCl<sub>2</sub>）に懸濁し、マイクロシリンジによって機械的に細胞を破壊する。得られた細胞ライセートを密度勾配遠心等により細胞膜分画、細胞質分画、核分画に分け、各画分のタンパク質をSDS-PAGEによって解析することができる。あるいは、培地中に分泌されるアルブミンやフィブリノーゲンのような肝細胞特異的マーカーを同様に解析してもよい。

小型肝細胞の成熟化の指標となり得る肝細胞特異的マーカーとしては、例えば、HNF4、HNF6、C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、およびトリプトファンジオキシゲナーゼ(TO)あるいはセリンデヒドロゲナーゼ(SDH)のホルモン誘導発現、トランスフェリン、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン、フィブリノーゲン、アルブミン等が挙げられる。

#### 【0023】

シート上に形成された肝組織は取り扱いが容易であるため、シート上に形成された肝組織は肝移植の目的に特に適している。移植は、培養時に培養液面側であった方、すなわち、肝組織が主として形成されている側を臓器側にして密着させ、そのご縫合または手術用のホッチキス等で固定すればよい。必要に応じて動物にFK506等の免疫抑制剤を投与してもよい。シートは生体吸収性であるため、通

常、約 1 ～ 2 週間程度で生体に吸収され、シート上に存在していた肝組織は生体内の肝臓に活着する。

### 【実施例】

#### 実施例 1. 小型肝細胞の分離方法

##### (1) 肝臓組織からの小型肝細胞の単離

成熟ラット（10 ～ 15 週齢）の肝臓をSeglenの方法に準じて、0.2mM EGTAを加えたCa、Mgを含まないハanks液で門脈から灌流した。40ml／分の流速で前述のハanks液を4分間流した後、0.02%コラゲナーゼ（ヤクルト）を含むハanks液を20ml／分の流速で10分間流した。消化された肝臓から常法に従って肝細胞をビーカー内にふるい落とした。細胞懸濁液を70 $\mu$ mのメッシュフィルターで濾過し、50 x gで1分間遠心した。上清を集め、再び50x gで5分間遠心した。沈殿した細胞を培養液（Leibovitz L-15、10%ウシ胎仔血清、 $10^{-7}$ Mデキサメタゾン、0.5 $\mu$ g/mlインスリンおよび抗生物質）で洗浄し、50 x gで5分間遠心した。同様の操作をもう一度繰り返し、更に150 x gで5分間の遠心を2回繰り返した後、再び50x gで5分間遠心した。沈殿した細胞を新しい培養液で懸濁し、小型肝細胞とした。生細胞数を数え、細胞密度を $1.0 \sim 2.0 \times 10^5$ 個/mlに調整した。

### 【0 0 2 4】

##### (2) 小型肝細胞の培養

(1) に記載したように調製した細胞を60mm培養皿に約  $6 \times 10^5$  個／培養皿の割合で播いた。空気培養基で3時間静置した後、培養液を取り替えた。培養液としては、以下の表 1 に示す、ダルベッコ改変イーグル培地を基本とした培地（小型肝細胞培養培地 I）を用いた。細胞は5%炭酸ガス培養器で37℃にて培養し、約2日に1回の割合で培地交換を行なった。培養後約1週間経過後に小型肝細胞のコロニーが明瞭に認識できるようになった。

## 【0025】

## 【表1】

表1. 小型肝細胞培養培地I

---

ダルベッコ改変イーグル培地	(GIBCO Laboratories)
+20mM HEPES	(Dojindo)
+25mM NaHCO <sub>3</sub>	(Katayama Chemical Co.)
+30mg/l L-プロリン	(Sigma Chemical Co.)
+0.5mg/l インスリン	(Sigma Chemical Co.)
+10 <sup>-7</sup> M デキサメタゾン	(Sigma Chemical Co.)
+10% FBS	(Hyclone Laboratories, Inc.)
+10mM ニコチンアミド	(Katayama Chemical Co.)
+1mM L-アスコルビン酸 2-ホスフェート	(Wako Pure Chemical Inc.)
+10 μg/l EGF	
+抗生物質	
(+1% ジメチルスルホキシド(DMSO)*	(Aldrich)

---

\* DMSOは培養4日目の培地交換から添加する。

## 【0026】

## (3) 小型肝細胞高含有コロニーの単離

培養後約1週間経過後、小型肝細胞のコロニーが明瞭に確認できるようになった時期に、以下のように小型肝細胞塊を調製した。

滅菌したリン酸緩衝液で細胞を2回洗浄した。その後、0.02%EDTAを含むリン酸緩衝液に細胞を浸した。数分間静置した後、リン酸緩衝液を吸引した。酵素を含まない細胞剥離液(Cell dissociation solution (Sigma)) 1mlを培養皿に入れ、37℃にて15分間静置した。次に、細胞に損傷を与えないように、細胞を静かにピペティングすることによって培養皿から細胞を慎重に剥がした。細胞を遠心管に集め、50 x gで5分間遠心した。上清を吸引した後10%血清を含む培養液で洗い、再び遠心した。上清を吸引後、種々の量の下記の表2に記載した無血清の培養液(小型肝細胞培養培地II)を加えて細胞懸濁液を調製し、小型肝細胞コロ

ニーの濃度を測定した。小型肝細胞コロニーの濃度は500～10,000個/mlとした。

このように調製した小型肝細胞コロニーを構成する細胞総数は、位相差顕微鏡で確認したところ $18.5 \pm 9.4$ 個であった。また、小型肝細胞コロニーに占める小型肝細胞の割合は、約70%～約90%であった。

### 【0027】

#### 【表2】

表2. 小型肝細胞培養培地II

---

ダルベッコ改変イーグル培地	(GIBCO Laboratories)
+20mM HEPES	(Dojindo)
+25mM NaHCO <sub>3</sub>	(Katayama Chemical Co.)
+30mg/l L-プロリン	(Sigma Chemical Co.)
+0.5mg/l インスリン	(Sigma Chemical Co.)
+10 <sup>-7</sup> M デキサメタゾン	(Sigma Chemical Co.)
+10mM ニコチンアミド	(Katayama Chemical Co.)
+1mM L-アスコルビン酸 2-ホスフェート	(Wako Pure Chemical Inc.)
+10 μg/l EGF	
+抗生物質	
<hr/>	
(+1% ジメチルスルホキシド(DMSO)*	(Aldrich)

---

\* DMSOは培養1日目から添加する。

### 【0028】

#### 実施例3. 小型肝細胞の肝組織への誘導(1)

実施例2で得られた小型肝細胞コロニーを $1.5 \sim 3.0 \times 10^3$ コロニー/cm<sup>2</sup>になるようにコロニーごと培養皿(直径35mmのディッシュ)に入れた。

そのまま5%炭酸ガス培養器で37℃にて培養した。継代後約1週間で小型肝細胞コロニーは第1日に比較して面積で平均3倍のコロニーを形成し、細胞数にして5倍まで増殖した(図1、2)。

継代後約2週間して、培養容器底面の約20%～約30%がコロニーで占められるようになった時点(約20%～約30%コンフルエント)で、Engelhorn肉腫(EHS肉

腫)から抽出した細胞外基質(商品名マトリゲル(Matrigel):基底膜成分からなり、ラミニン70%、IV型コラーゲン15%、プロテオグリカン、エンタクチン等を含む)を500 $\mu$ g/mlの濃度で培養液に添加した。

更に2日間培養後、培養液をMatrigelを含まない培養液に交換して再び培養を続け、48時間毎に肝細胞特異的マーカーを測定した。

#### 【0029】

その結果、Matrigelによる誘導後第2日目～第10日目で、成熟肝細胞のみに発現すると考えられる転写因子のC/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、肝細胞核因子4(HNF4)および肝細胞核因子6(HNF6)などが顕著に誘導された(図3～図6)。これらの因子の誘導の確認は、20 $\mu$ gの核抽出タンパク質を電気泳動し、ウェウタンブロットを行ない、各バンドの相対強度を測定することによって行なった。陽性対照としては成熟肝細胞のタンパク質を用い(MH)、陰性対照としてはMatrigelを添加しない小型肝細胞高含有コロニーからの抽出タンパク質(C)を使用した(図3～図6)。

更にこれらの転写因子によって発現が調節されと考えられているトリプトファン2-ジオキシゲナーゼ(TO)、セリンデヒドラターゼ(SDH)のホルモン誘導が見られるようになった(図12、13)。誘導の確認は、以下のように行なった:小型肝細胞高含有コロニーに500 $\mu$ g/mlのMatrigelを添加し、その後、培養9日目に10<sup>-5</sup>Mデキサメタゾンおよび10<sup>-7</sup>Mグルカゴンを添加した。24時間後に細胞を集め、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質の20 $\mu$ gをウェスタンブロット解析にかけ、各バンドの強度を測定し相対強度を測定した。陽性対照としては成熟肝細胞のタンパク質を用い(MH)、陰性対照としてはMatrigelを添加しない小型肝細胞高含有コロニーからの抽出タンパク質(C)を使用した。

#### 【0030】

また、アルブミン、トランスフェリン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、フィブリノーゲンの培養液中の分泌も確認された(図7～10)。これらのタンパク質の分泌は、1 $\mu$ lの培養上清を電気泳動し、ウェウタンブロットを行ない、各バンドの相対強度を測定することによって行なった。陽性対照(N)としては正常ラット血清または血漿を用い、陰性対照(C)としてはコラーゲン被覆培養皿で培養した

小型肝細胞高含有コロニーの培養上清を使用した（図 7～10）。

代表的な結果である、アルブミンの培養液中への分泌のより詳細な経時変化を特に図 11 に示した。これらの結果は、小型肝細胞の成熟化、すなわち肝組織への誘導が細胞外基質によって著しく加速されることを示すものである。

#### 【0031】

細胞外基質が接触した小型肝細胞は、急速にその体積を増し、細胞質が大きくなった。しかしながら、培養皿に接している面の面積はあまり大きくならないため、増えた体積分だけ丈が高くなり隣り合う細胞との接触面が大きくなった。細胞間には、細胞間結合がよく発達し、タイト結合で強固に結合し、その間には毛細胆管が形成され、その中には胆汁に類するものも分泌可能になった。また、ギャップ結合もよく発達するようになり、細胞間コミュニケーションが良くなった。細胞質には、ミトコンドリア、ゴルジ装置、ペルオキシソームなどの細胞内小器官がよく発達し、グリコーゲン顆粒もよく見られるようになった。これらの結果は小型肝細胞が生体内の成熟肝細胞と同様の機能を持ちうることを示すものである。

#### 【0032】

##### 実施例 4. 小型肝細胞の肝組織への誘導（2）

実施例 2 で調製された小型肝細胞コロニーを細胞コロニーごと吸収性コラーゲンシート（商品名 Helistat）または吸収性ポリグルコール酸フェルトシート（商品名 Neoveil）上に載せた。

2.5cm x 2.5cm の大きさの上述のシートに、実施例 2 で調製された小型細胞コロニー懸濁液（1,500～3,000 コロニー/ml）をゆっくりと滴下した。十分な小型肝細胞コロニー（総細胞数、約 2,800～5,000 個）を載せた後、5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 37℃ にて約 1 時間そのまま静置した。このシートに表 2 に示した培養液を加え、更に 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 37℃ に培養を続けた。

#### 【0033】

シートに接着した小型肝細胞はゆっくりと増殖し、シート上の培養第 2 日目において既に形態変化が観察された。シートの繊維の隙間や上に接着したコロニーの細胞は周りを囲むコラーゲン繊維に接着するため細胞が立方状になり盛んに分

裂した。狭い空間内で細胞が増えるために細胞間の接着面が大きくなった。適当な細胞密度になると細胞は分裂を停止し細胞質が大きくなった。細胞間には、細胞間結合がよく発達し、タイト結合で強固に結合し、その間には毛細胆管が形成され、その中には胆汁に類するものも分泌可能になった。また、ギャップ結合もよく発達するようになり、細胞間コミュニケーションが良くなった。細胞質には、ミトコンドリア、ゴルジ装置、ペルオキシソームなどの細胞内小器官がよく発達し、グリコーゲン顆粒もよく見られるようになった。これらの結果は小型肝細胞が生体内の成熟肝細胞と同様の機能を持ちうることを示すものである。

細胞外基質をかけなくても成熟化が誘導されるのはこのような物理的な要因で細胞が固定されるためと考えられる。

#### 【0034】

また、シート上の培養第7日～15日において、1  $\mu$ lの培養上清を電気泳動し、ウェスタンブロット解析にかけ、各バンドの相対強度を測定した。その結果、アルブミン、トランスフェリン、ハプトグロブリン、フィブリノーゲン等の成熟肝細胞に特徴的なタンパク質の分泌が顕著に増加したことが示された(図14～図17)。特にアルブミンの分泌はシート上の培養開始第2日目より顕著に見られた(図14)。

この実験においても、コラーゲンシート上で培養した小型肝細胞コロニーはコラーゲン被覆培養皿上で培養した小型肝細胞コロニーに比較して顕著に成熟化が起こることが示された。

#### 【0035】

##### 実施例5. 小型肝細胞から誘導された肝組織の移植

実施例4に記載したように、コラーゲンシート上で小型肝細胞を14日間培養して形成された小型肝細胞コロニー由来の肝組織をシートごと無アルブミンラットに移植した。

麻酔下にラットの腹部を切開し、肝臓を露出させその約2/3を切除した。残存肝にシート上で形成された肝組織をシートごと培養液面、すなわちコロニー側を臓器側にして載せ、手術用ホッチキスでシートを固定し、切開部を縫合した。また、ラットにはFK506等の免疫抑制剤を投与した。



**【発明の効果】**

本発明により、移植可能な肝組織の調製に適した小型肝細胞集塊を調製すること、およびその小型肝細胞集塊からの肝組織への成熟化誘導が簡便に行なえるようになる。特に生体吸収性シート上で本発明の小型肝細胞高含有コロニーから形成された肝組織はシートごと生体肝への移植が可能であるため、本発明により、損傷を受けた肝臓の修復を容易に行なうことができる。

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

コロニーを剥離して新しい培地に移した後に接着しているコロニー数を位相差顕微鏡で観察したものである。コロニーの同定は、培養皿に目印をつけて、それを指標に行なった。6つの培養皿から得られたデータの平均値と標準偏差を示した。

**【図 2】**

コロニーを構成する細胞数を示すグラフである。肝細胞マーカーであるサイトケラチン 8 で免疫染色した細胞数を顕微鏡下で数えた。1 回の実験に 3 枚の培養皿を使用し、2 回の実験から得られたデータの平均と標準偏差を示した。

**【図 3】**

Matrigel による C/EBP  $\alpha$  タンパク質の誘導。MH：成熟肝細胞、0（日）：処理開始前、C：対照（Matrigel 無添加）、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

**【図 4】**

Matrigel による C/EBP  $\beta$  タンパク質の誘導。MH：成熟肝細胞、0（日）：処理開始前、C：対照（Matrigel 無添加）、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

**【図 5】**

Matrigel による HNF4  $\alpha$  タンパク質の誘導。MH：成熟肝細胞、0（日）：処理開始前、C：対照（Matrigel 無添加）、M：Matrigel 添加 (500  $\mu$ g/ml) をそれぞれ意味する。

**【図 6】**

MatrigelによるHNF6タンパク質の誘導。MH：成熟肝細胞、0（日）：処理開始前、C：対照（Matrigel無添加）、M：Matrigel添加(500 $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

【図 7】

培養液中に分泌されるアルブミン量。N：正常ラット血清または血漿、C：対照（Matrigel無添加）、M：Matrigel添加(500 $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

【図 8】

培養液中に分泌されるトランスフェリン量。N：正常ラット血清または血漿、C：対照（Matrigel無添加）、M：Matrigel添加(500 $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

【図 9】

培養液中に分泌される $\alpha$ 1—アンチトリプシン量。N：正常ラット血清または血漿、C：対照（Matrigel無添加）、M：Matrigel添加(500 $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

【図 10】

培養液中に分泌されるファイブロネクチン量。N：正常ラット血清または血漿、C：対照（Matrigel無添加）、M：Matrigel添加(500 $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

【図 11】

培養液中に分泌されるアルブミン量の経時変化。コロニーを分離・播種後11日間培養し、11日目にMatrigel（500 $\mu$ g/ml）を2日間添加した場合と添加しない場合の小型肝細胞のアルブミン分泌量を比較した。

【図 12】

トリプトファンジオキシゲナーゼタンパク質の発現誘導。  
MH：成熟肝細胞、0日：処理開始前、C：対照（Matrigel無添加）、M：Matrigel添加(500 $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

【図 13】

セリンデヒドラターゼタンパク質の発現誘導。MH：成熟肝細胞、0日：処理開始前、C：対照（Matrigel無添加）、M：Matrigel添加(500 $\mu$ g/ml)をそれぞれ意味する。

## 【図 14】

シート上で培養された小型肝細胞が分泌するアルブミン量の経時変化。■：シート上の培養、◆：コラーゲン被覆培養皿上の培養（対照）。

## 【図 15】

シート上で培養された小型肝細胞によって培養液中に分泌されるトランスフェリン量。N：正常ラット血清または血漿、C：対照（コラーゲン被覆培養皿上の培養）、S：コラーゲンシート上の培養をそれぞれ意味する。

## 【図 16】

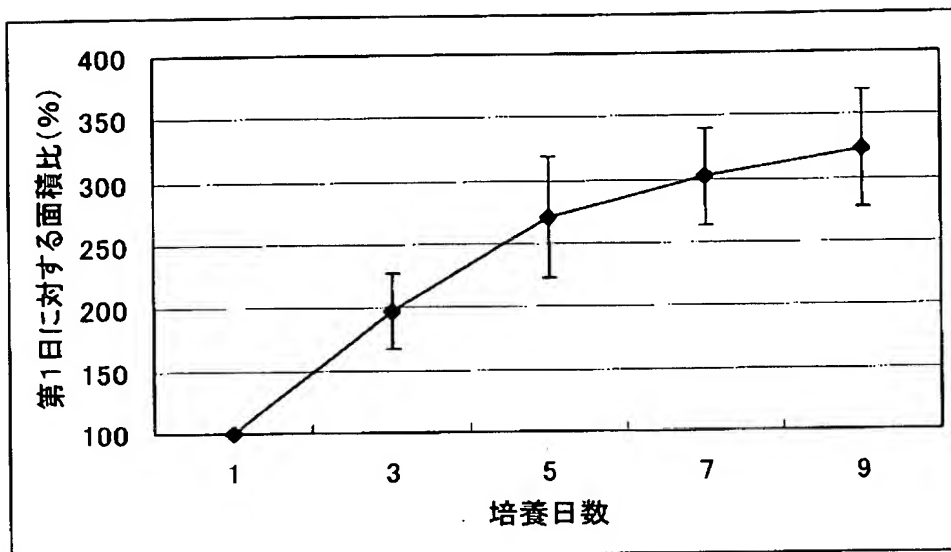
シート上で培養された小型肝細胞によって培養液中に分泌されるハプトグロブリン量。N：正常ラット血清または血漿、C：対照（コラーゲン被覆培養皿上の培養）、S：コラーゲンシート上の培養をそれぞれ意味する。

## 【図 17】

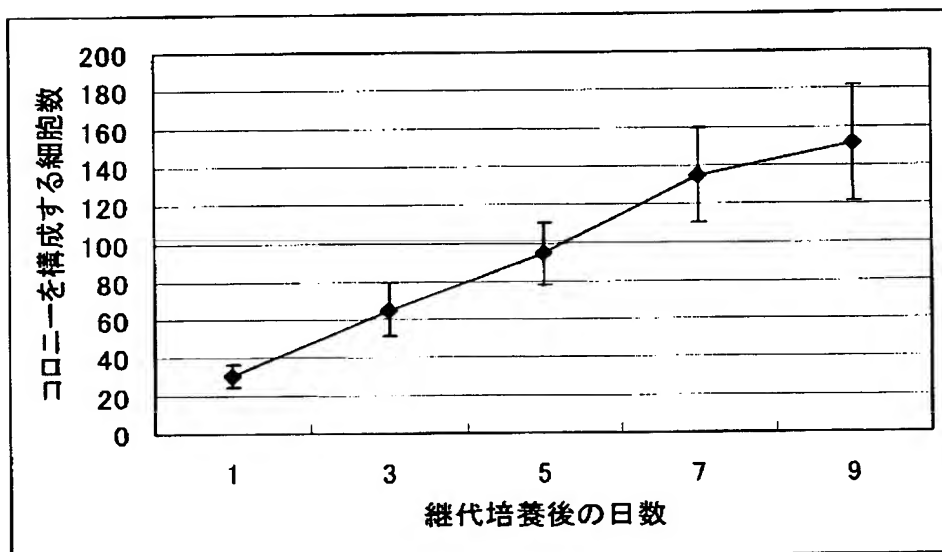
シート上で培養された小型肝細胞によって培養液中に分泌されるフィ브리ノーゲン量。N：正常ラット血清または血漿、C：対照（コラーゲン被覆培養皿上の培養）、S：コラーゲンシート上の培養をそれぞれ意味する。

【書類名】 図面

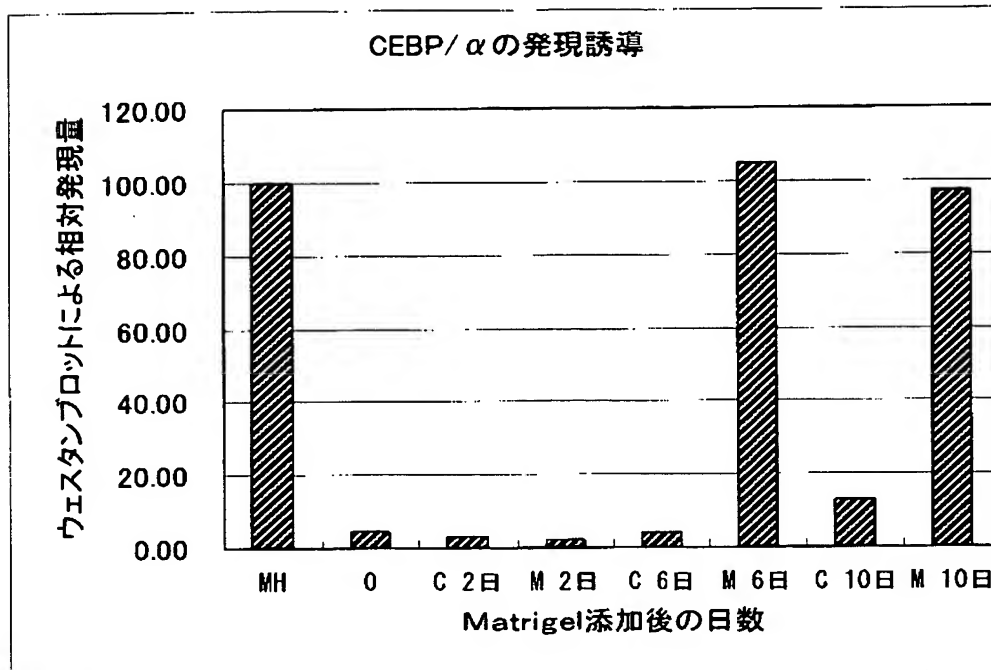
【図1】



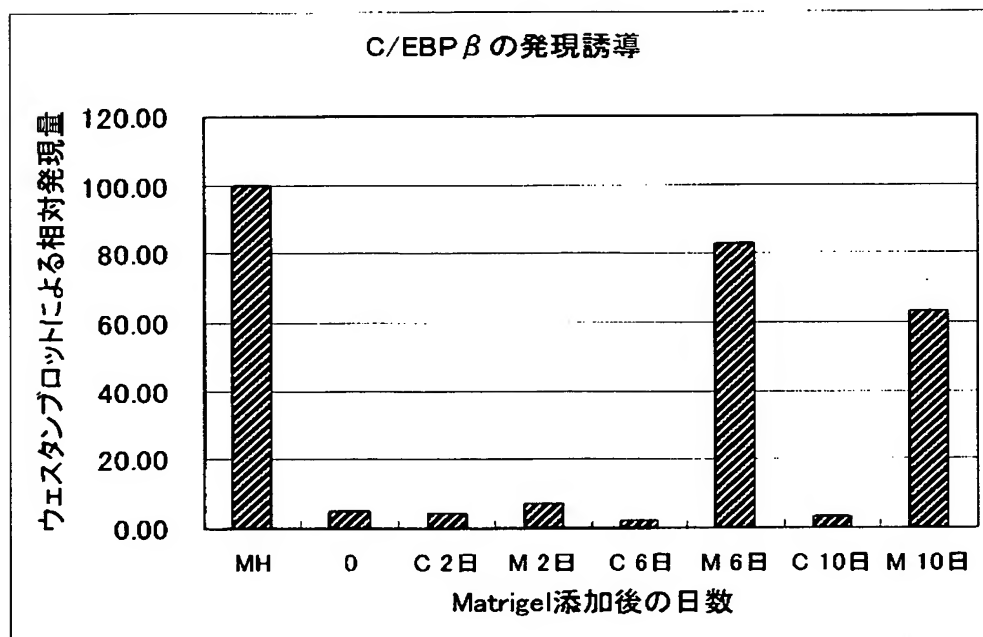
【図2】



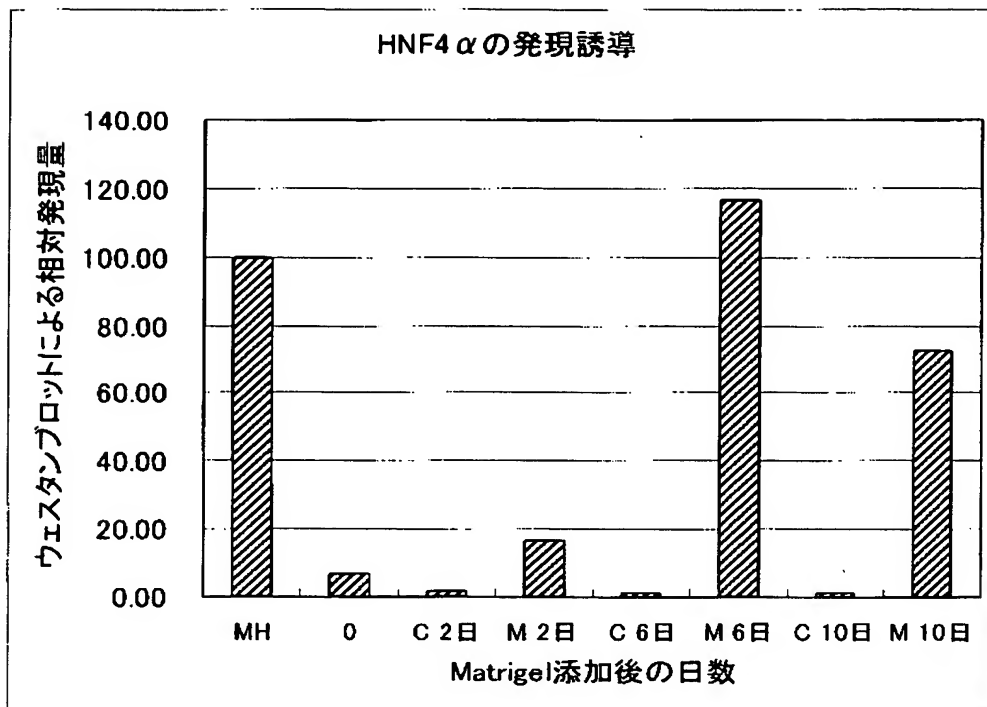
【図 3】



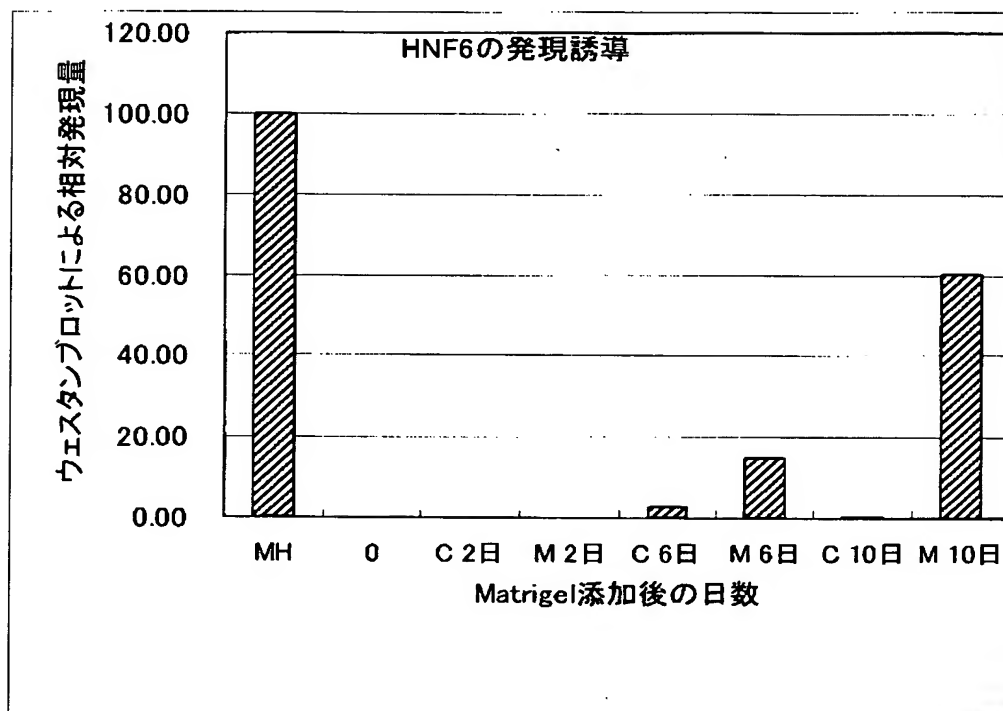
【図 4】



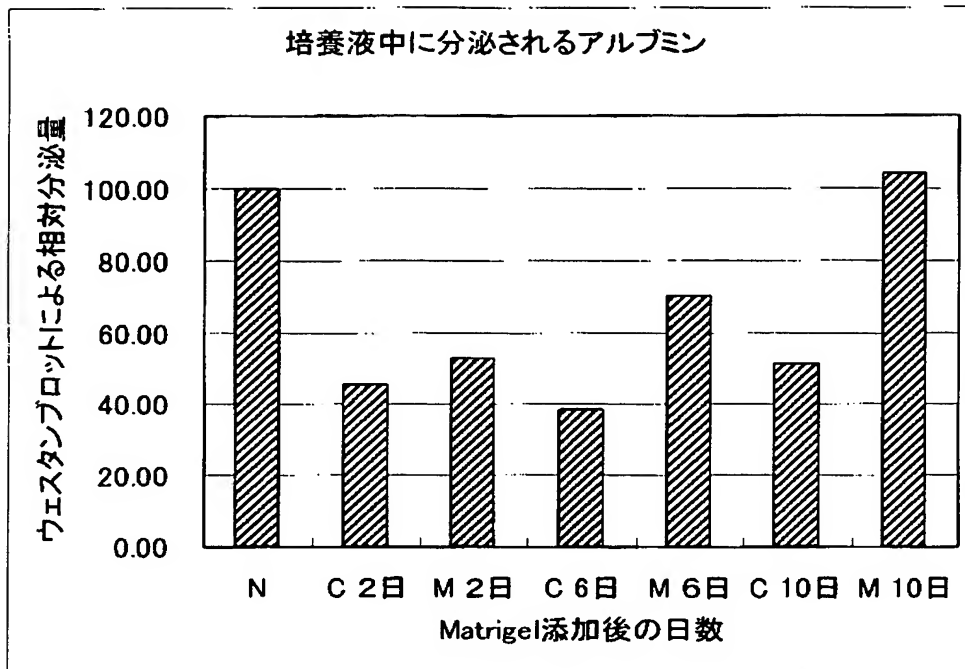
【図 5】



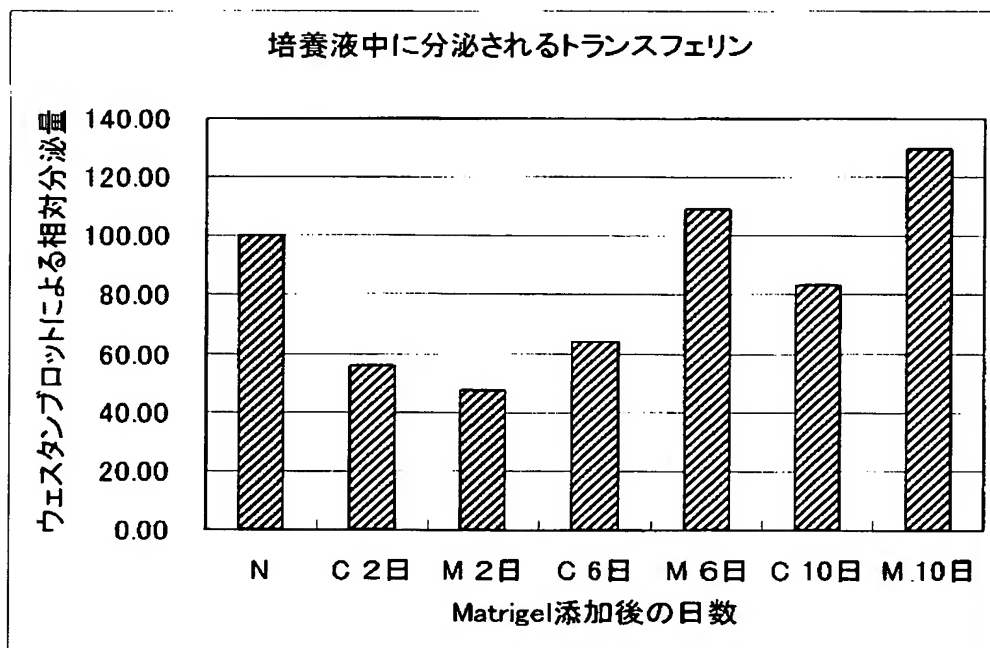
【図 6】



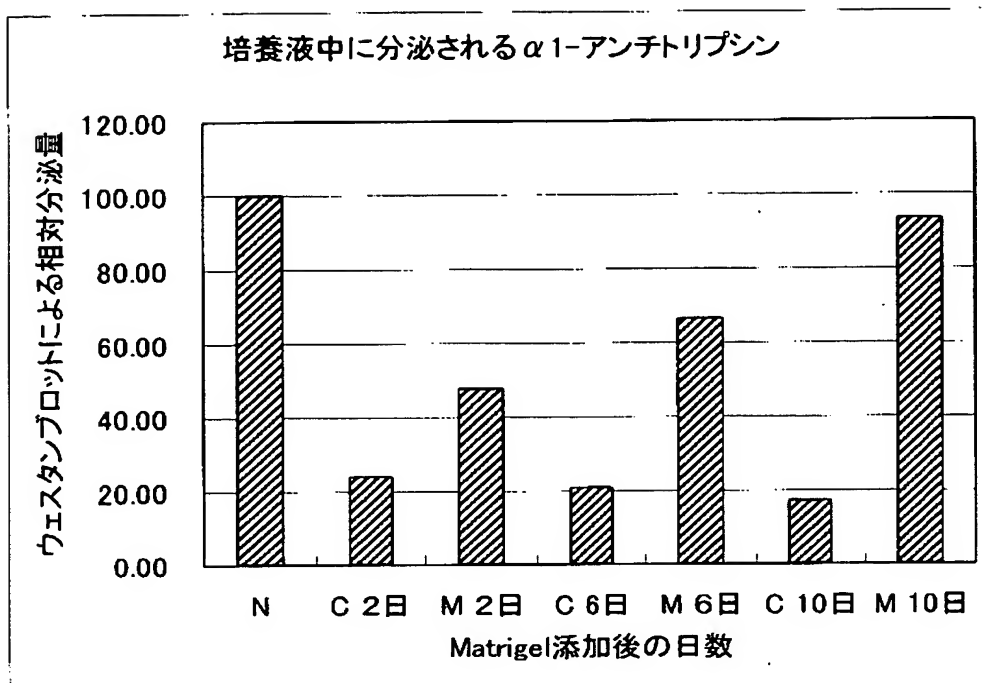
【図 7】



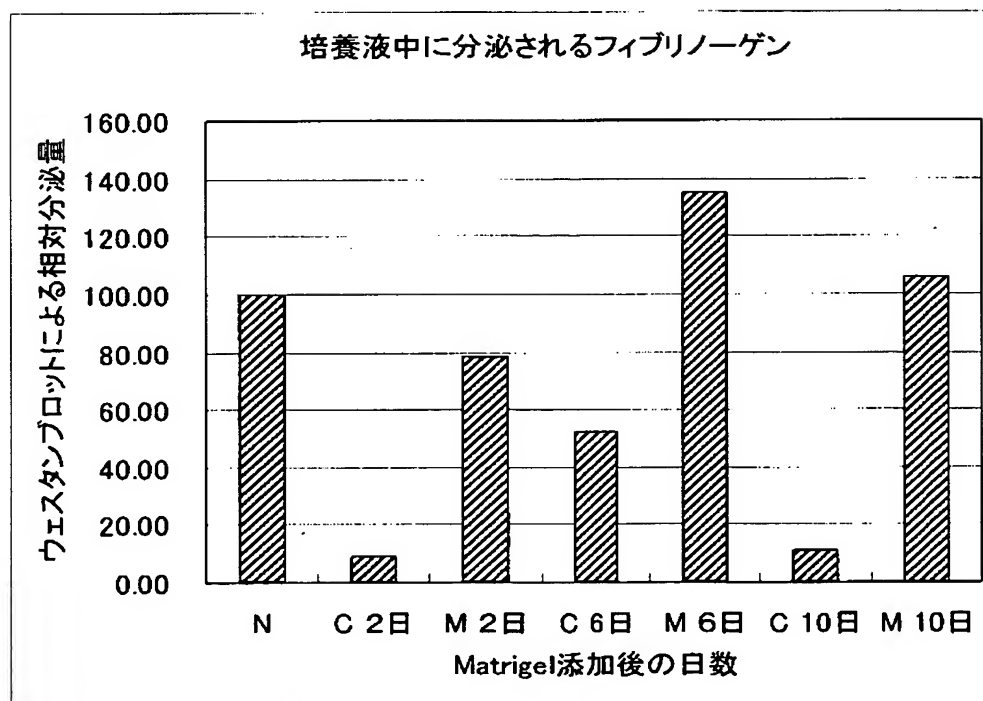
【図 8】



【図 9】

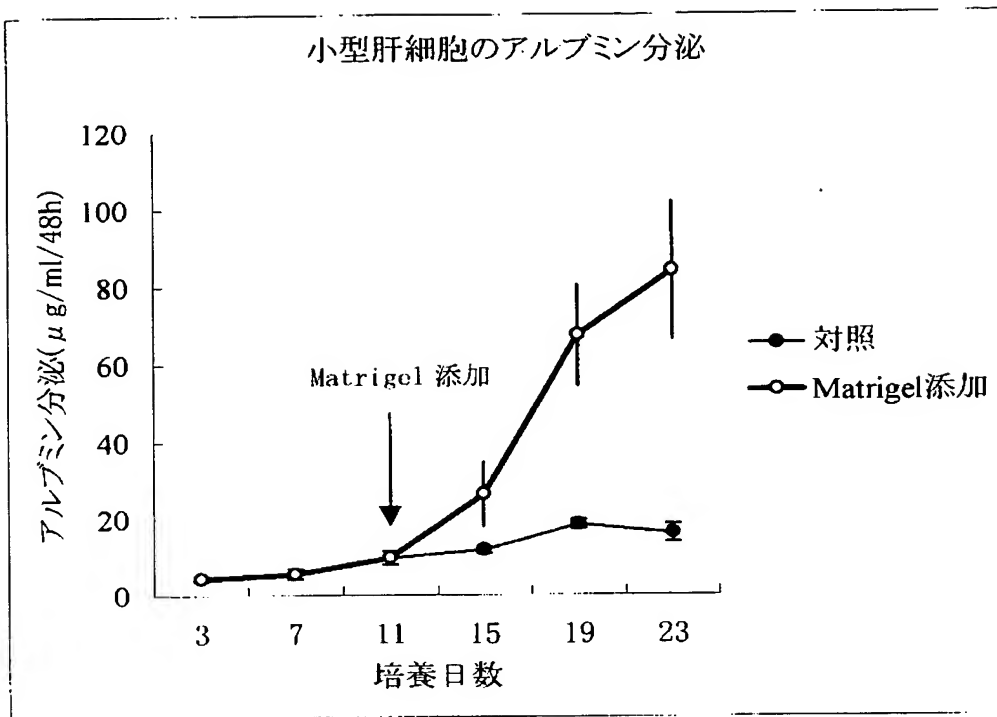


【図 10】

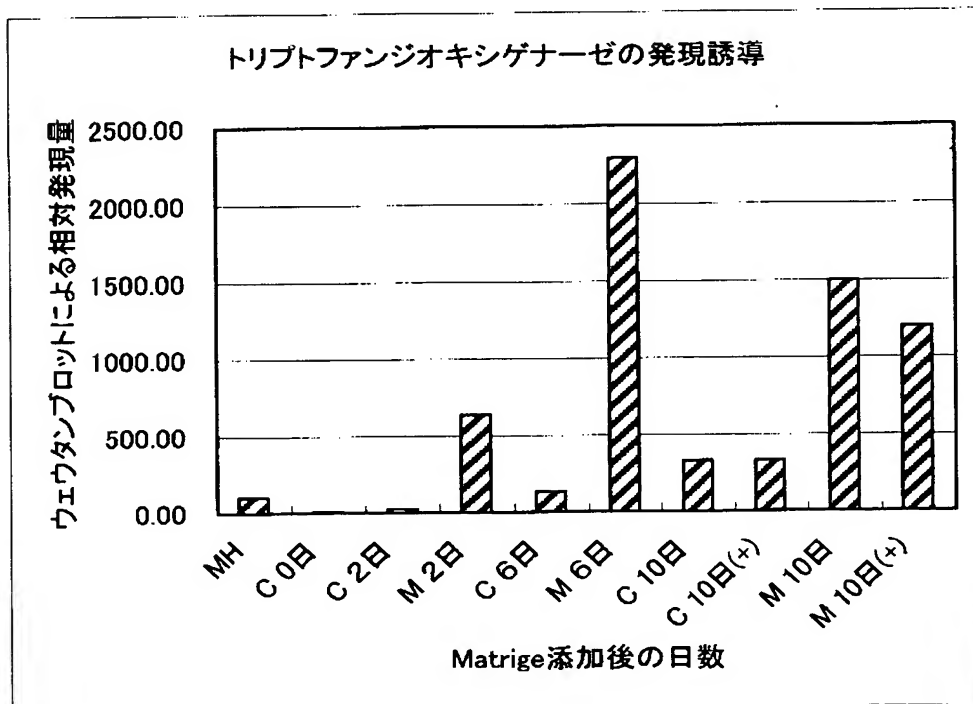




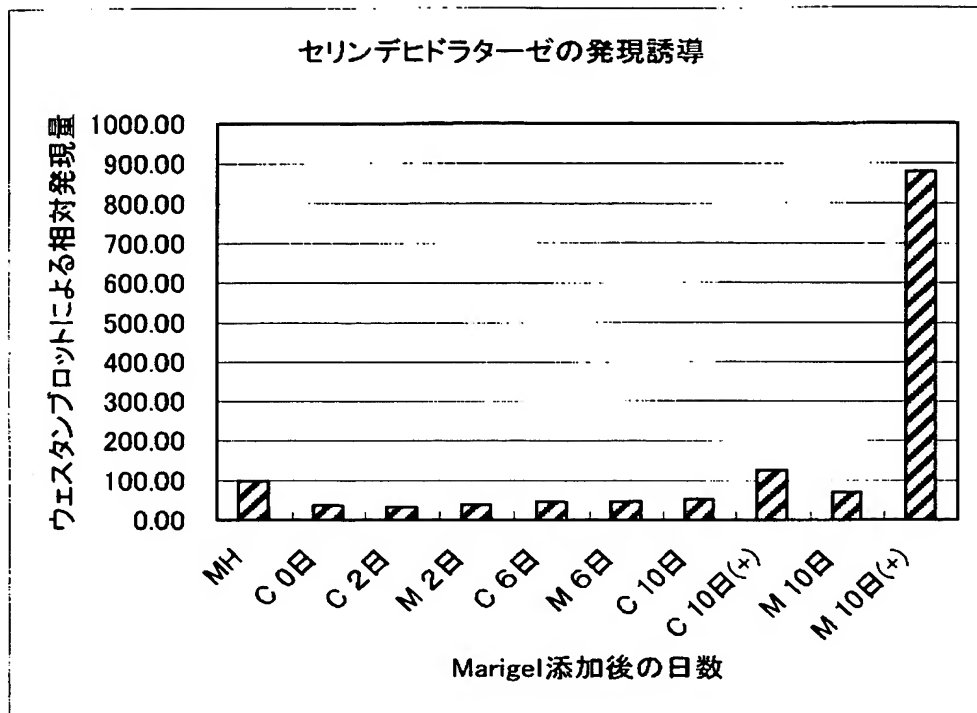
【図 1 1】



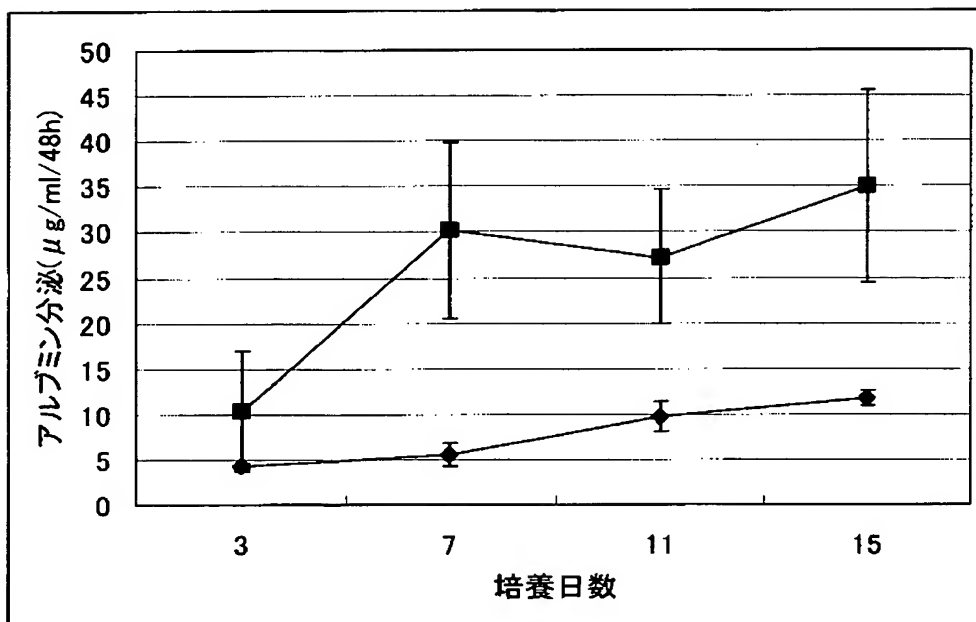
【図 1 2】



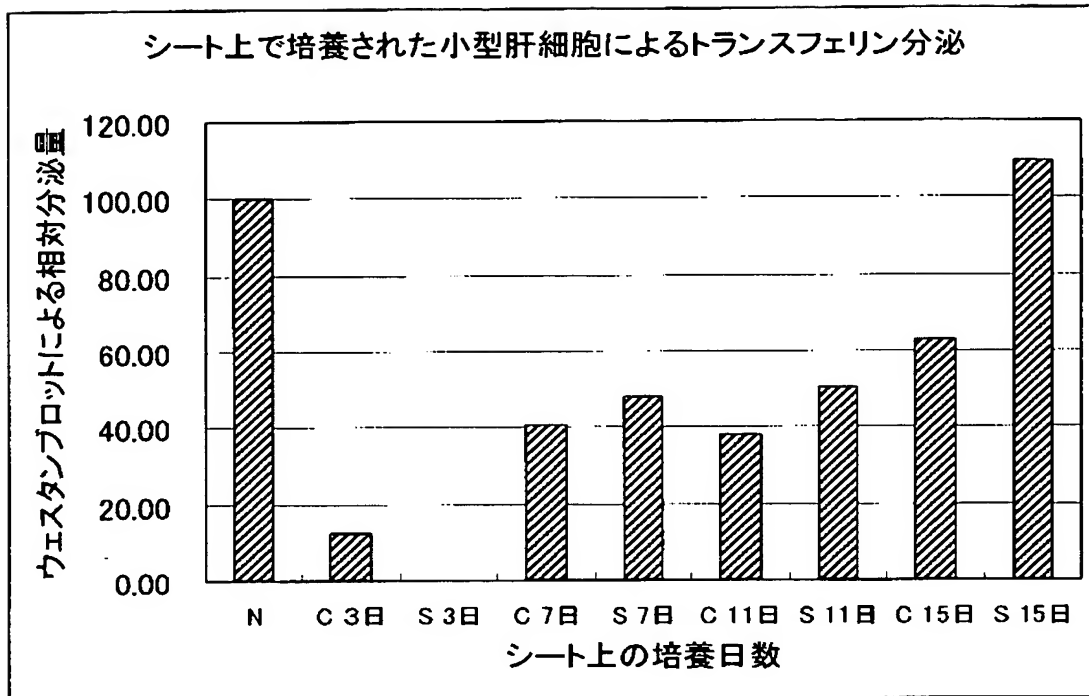
【図 13】



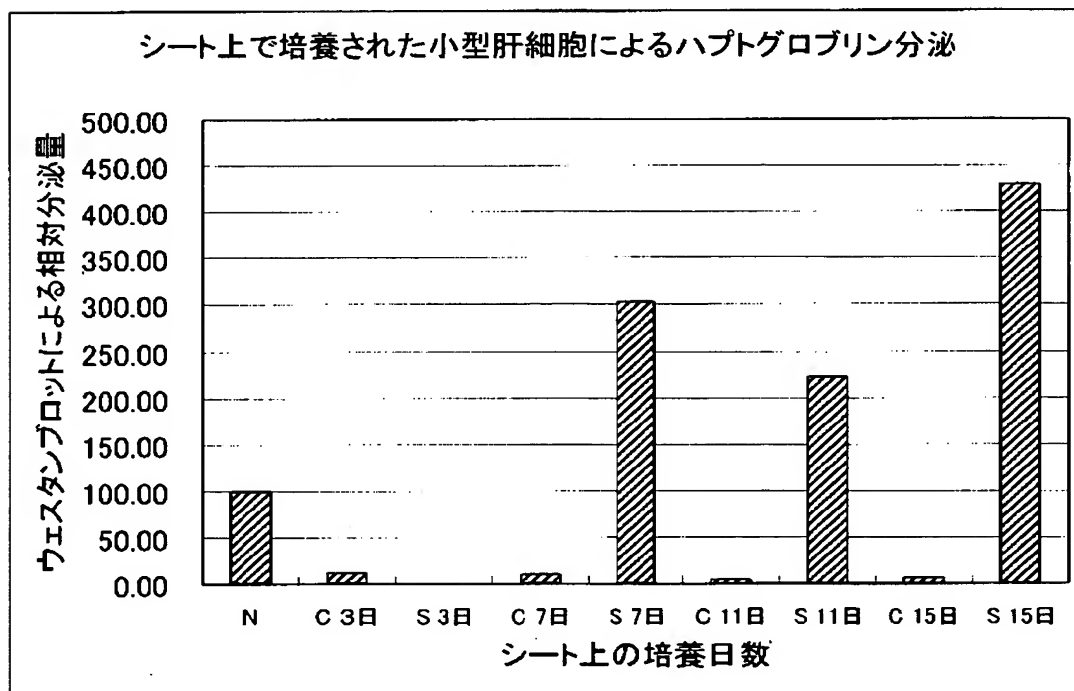
【図 14】



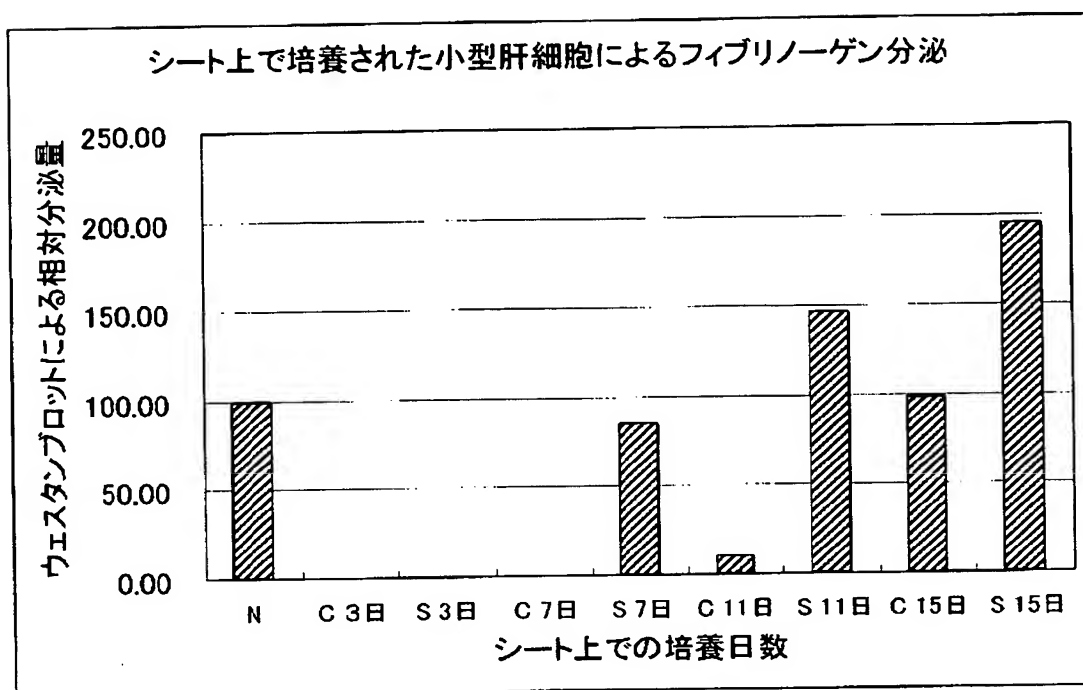
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 移植可能な肝組織を調製する方法、そのために適した細胞コロニーおよびその調製方法を提供すること。より具体的には、本発明は移植可能な肝組織を調製するために適した小型肝細胞コロニー、その調製方法、その小型肝細胞コロニーから肝組織を誘導する方法を提供すること。

【解決手段】 全細胞の約70%以上が小型肝細胞によって構成されている小型肝細胞高含有細胞コロニー、特に、約10個～約30個の細胞からなり、小型肝細胞数が全細胞数の約70%以上を構成する小型肝細胞高含有細胞コロニー。また、肝臓から単離された、または、継代された培養中の小型肝細胞を含む10個～30個の細胞からなる細胞コロニーが形成された時点で、非酵素的に単離することを特徴とする、小型肝細胞高含有コロニーの調製方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 1 - 1 2 5 5 2 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 8 0 0 0 0 0 0 2 4 ]

1 . 変更年月日

2 0 0 0 年    1 月    6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

北海道札幌市北区北 7 条西 2 丁目 8 番地 1

氏 名

北海道ティー・エル・オー株式会社